

УДК 577.215.+602.6

КЛОНУВАННЯ КДНК ІЗОФОРМИ КАТАЛАЗИ CAT2 ARABIDOPSIS THALIANA З ВИКОРИСТАННЯМ ДВОЕТАПНОЇ ПЛР

Н.О. ДІДЕНКО, Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна, 58012, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Мета. Члени мультигенних родин часто бувають високогомологічними в межах кодуючої ділянки, що ускладнює клонування їх індивідуальних кДНК. Метою роботи були розробка стратегії, що дає можливість ефективно клонувати кДНК таких генів, та її застосування для клонування кДНК каталази 2 (Cat2) *Arabidopsis thaliana*. **Методи.** Проводилося порівняння послідовностей кДНК каталази для того, щоб ідентифікувати диверговані ділянки, які придатні для створення геноспецифічних праймерів. З використанням зворотної транскриптази та ПЛР було ампліфіковано та клоновано кДНК Cat2. **Результати.** Показано, що кДНК трьох генів каталаз *A. thaliana* високогомологічні на 5'- та 3'-кінцях кодуючої ділянки. Проте розташовані поряд послідовності 5'- та 3'-нетрансльованих ділянок відмінні. Відповідно, було створено пару геноспецифічних праймерів, які локалізовані у 5'- та 3'-нетрансльованих ділянках кДНК Cat2. Ці праймери було використано на першому етапі ПЛР. Отримані ПЛР-продукти слугували матрицями на другому етапі ПЛР. Відповідні праймери розташовувалися точно в ділянках старт- і стоп-кодонів кДНК Cat2 та містили додатково сайти рестрикції, необхідні для наступного клонування. **Висновки.** Використання стратегії двоетапної ПЛР дозволяє ефективно клонувати індивідуальні кДНК близькоспоріднених високогомологічних членів мультигенних родин.

Ключові слова: мультигенні родини, клонування генів, кДНК, ПЛР, каталаза.

Вступ. Для геномів судинних рослин характерна присутність мультигенних родин [1–5]. Окремі копії послідовностей, що входять до складу мультигенної родини, можуть бути практично ідентичними. Проте в більшості випадків члени мультигенної родини до певної міри відрізняються між собою, що забезпечує кодування декількох варіантів (ізоформ) відповідного білка. Такі ізоформи можуть виконувати різні або однакові функції. В останньому випадку поясненням існуючого поліморфізму білків є фізіологічна необхідність вибірково (диференційно) змінювати їхню експресію у різних тканинах та органах залежно від фази онтогенезу, змін, що відбуваються в навколишньому середовищі, тощо. Мультигенні родини можуть налічувати від двох (рибосомні білки, глутатіон редуктаза та ін. [6–8]) до декількох десятків (гваякол пероксидаза, актини тощо [9–14]) членів. На загал, роль окремих членів мультигенних родин та кодованих ними ізоформ білків, а також шляхи регуляції їхньої експресії вивчені все ще недостатньо, хоча необхідність подальших поглиблених експериментів на молекулярному рівні не викликає сумніву. Зручною моделлю для таких досліджень є малочисленні мультигенні родини, оскільки для кожного з їхніх членів

можна досить легко створити рослини з відсутньою (нокаутні лінії) або, навпаки, з надлишковою експресією (надекспресори) окремих ізоформ.

Одну з малочисленних мультигенних родин утворюють гени, що кодуєть каталазу. Зокрема, у модельної рослини *Arabidopsis thaliana* наявні три ізоформи цього ферменту [15–19]. Раніше у нашій лабораторії ми досліджували фізіолого-біохімічні особливості нокаутних ліній арабідопсису за генами каталази *Cat2* та *Cat3*. На наступному етапі досліджень постало завдання клонувати ген *Cat2* для подальшого використання його у створенні трансгенних рослин з підвищеною експресією відповідної ізоформи.

Матеріали і методи

Отримання кДНК. Загальну РНК виділяли з використанням денатуруючого буферу, який містив 4 М гуанідінітіоціанат, 25 мМ цитрат натрію (рН=7,0), 0,1 М 2 – меркаптоетанол та 0,5% саркозил [20]. Виділення полі(А)⁺-мРНК здійснювали за допомогою набору Oligotex kit (Qiagen, США). 50 нг полі(А)⁺-мРНК конвертували в кДНК, використовуючи праймер oligoT₁₈ та зворотну транскриптазу RNase minus (ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen, Carlsbad, CA, США).

Отриману кДНК використовували як матрицю у ПЛР, застосовуючи для цього геноспецифічну пару праймерів Cat2N-St (5' -AATCTCTCCAAGTCTCTTCTCATCAA-3') та Cat2N-Fin (5' -AACACAGAAAGG CCAATCAAGA-3'). Кількість кДНК для проведення ПЛР складала близько 10 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1×буфер для ПЛР (Phusion HF Buffer, Finnzymes, Фінляндія), суміш dNTP – 0,2 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (Phusion DNA Polymerase, Finnzymes) – 1 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл. ПЛР про-

водилася з використанням приладу MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: 1) початкова активація ДНК-полімерази – 98 °С, 30 с; 2) денатурація ДНК – 98 °С, 5 с; 3) гібридизація праймерів – 64 °С, 30 с; 4) синтез ДНК – 72 °С, 40 с; 5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 10 хв; 6) припинення реакції – 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Для аналізу результатів ПЛР використовували електрофорез у 1% агарозному гелі [21].

Очищені ПЛР-продукти використовували для наступної ПЛР зі специфічними для *Cat2* праймерами Cat2 – St (5'-CATATCTAGAACA-ATGGATCCTTACAA GTATCGTCCAGC-3') та Cat2 – Fin (5'-GACTCTAGAA-TTAGATGCTTGGTCTCACGTTTCAGA-3'). Ця пара праймерів містила додатковий сайт впізнавання рестриктази *Xba*I (підкреслено), який використовували для клонування ПЛР-продуктів у вектор рBluescript II KS⁺. Для лігування використовували Т4 ДНК-лігазу (Fermentas, Литва). Лігазну суміш інкубували за 22 °С протягом двох годин.

Продукти лігування трансформували у компетентні клітини лінії *Escherichia coli* XL-blue методом електропорації з використанням приладу E. coli Pulser (BioRad, США). Присутність вставки у складі рекомбінантних плазмід перевіряли методом *blue-white colony selection* та підтверджували рестриктазним картуванням.

Аналіз продуктів ПЛР та рестриктазної реакції проводили методом електрофорезу в 1% агарозному гелі. В якості ДНК-маркера використовували GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва). Візуалізацію ДНК проводили в ультрафіолетовому світлі з використанням програмного забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Сиквенування отриманих рекомбінантних плазмід проводили з використанням Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied

Biosystems, США). Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [22]. Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST [23].

Результати та обговорення

Першим кроком нашої роботи було отримання кДНК *Cat2* шляхом ПЛР-ампліфікації. При цьому слід було врахувати, що члени мультигенної родини можуть бути високоподібними між собою. Отже, при створенні геноспецифічних праймерів необхідно було спочатку оцінити подібність кодуючих районів генів *Cat* та виявити ділянки, які відрізняють їх між собою. Відповідно, нами було проведено пошук нуклеотидних послідовностей кДНК для всіх трьох генів *Cat* арабідопсису у базі даних Genbank. Знайдені послідовності

кДНК для *Cat1*, *Cat2* та *Cat3* порівняли між собою з використанням програми MegAlign з пакета програм DNASTAR (рис. 1). Отримані результати показали, що кодуюча частина *Cat1* та *Cat2* має 78,1% гомології, а *Cat2* та *Cat3* – 73,4%. Отже, гени, що кодують каталазу, демонструють середній рівень подібності у послідовності кодуючих ділянок.

Для отримання повнорозмірної кДНК *Cat2*, придатної для створення рослиннадекспресорів, необхідно було розробити геноспецифічні праймери для проведення ПЛР, які мали забезпечити ампліфікацію кДНК *Cat2* від старт- до стоп-кодону. Проте порівняння послідовностей показало, що саме в районі старт та стоп кодонів всі три гени є високогомологічними. Відповідно, стало зрозумілим, що розробити для цих ділянок специфічні праймери для ампліфікації тільки одного з членів мультигенної родини практично неможливо. Тому для створення праймерів було вирішено

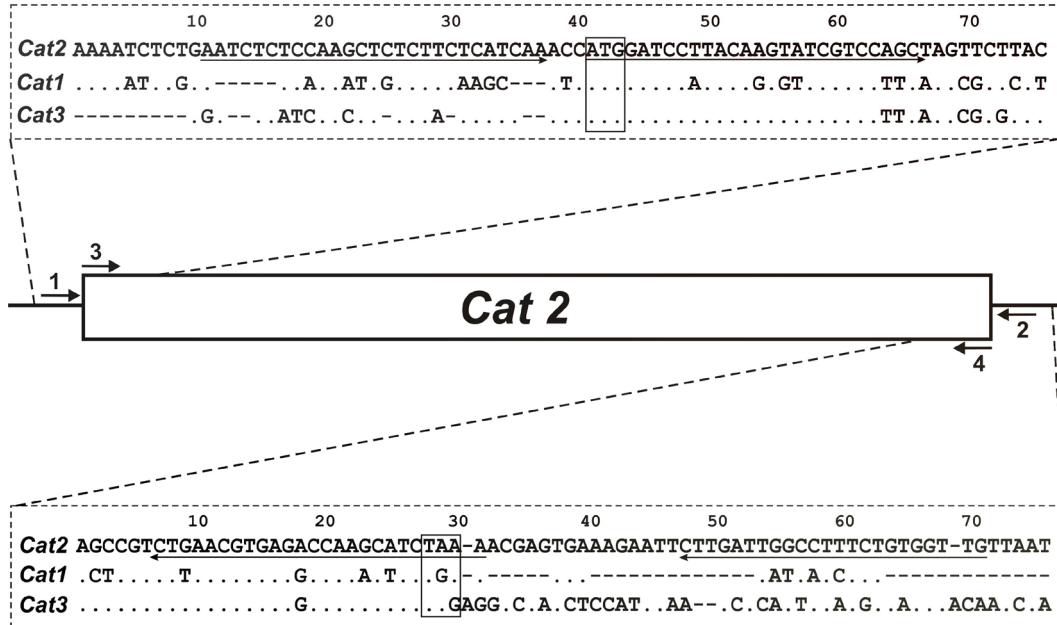


Рис. 1. Порівняння фрагментів кДНК трьох ізоформ каталази *Arabidopsis thaliana*. Стрілками вказано місця гібридизації праймерів: Cat2N-St (1), Cat2N-Fin (2), Cat2 – St (3), Cat2 – Fin (4), які було використано для ПЛР-ампліфікації.

застосувати 5'- та 3'-нетрансльовані ділянки (UTR), які присутні у складі мРНК ізоформ каталази. Для цього ми проаналізували послідовності, що знаходяться перед старт- та після стоп-кодону. Вирівнювання цих послідовностей показало суттєво нижчий рівень подібності порівняно з кодуючими послідовностями, що дало нам можливість спроектувати специфічні для *Cat2* праймери Cat2N-St (5'-ААТСТСТССААГС ТСТСТТСТСАТCAA-3') та Cat2N-Fin (5'-ААССАСAGAAAGGCCAATCAAGA-3'), які гібридизуються з 5'- та 3'-UTR.

Ці специфічні праймери були використані для ПЛР з кДНК в якості матриці. Електрофоретичний аналіз отриманих ПЛР-продуктів показав наявність лише одного ампліфікату. Його довжина становила близько 1500 пн, що відповідає теоретично очікуваному розміру (рис. 2).

Отриманий ПЛР-продукт піддали контрольному сиквенуванню, яке підтвердило, що він є практично ідентичним до послідовності кДНК *Cat2*. Проте у положенні 1227 нп знайдено одну транзицію G→A, яка відрізняє отриману нами послідовність від відомої з бази даних. Проте ця заміна не впливає на амінокислотну послідовність білка, оскільки вона мала місце у третьому положенні кодону для проліну, тобто виявлена нами заміна виявилася синонімічною. Відмінність отриманої нами послідовності від відомої раніше може бути пов'язана з

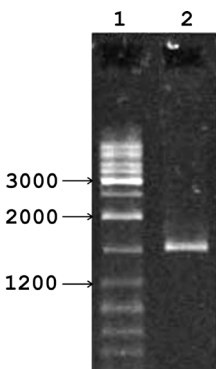


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів, отриманих із застосуванням праймерів Cat2N-St та Cat2N-Fin: 1 – маркер; 2 – ПЛР-продукт

тим, що використана для експериментів кДНК була отримана для *A. thaliana* екотипу С24, тоді як послідовність *Cat2* з Genbank відповідає екотипу Columbia 0.

Наступним етапом нашої роботи було проведення ПЛР, у якій як матрицю використовували ампліфікат *Cat2*, отриманий у попередній реакції. Відомо, що для ефективної трансляції мРНК старт-кодон повинен перебувати у контексті послідовності Козака, яка забезпечує ефективну взаємодію мРНК із рибосомою [24]. Тому на наступному етапі експерименту було сконструйовано другу пару праймерів *Cat2* – St та *Cat2* – Fin таким чином, щоб отриманий у результаті ПЛР продукт містив послідовність Козака, а також сайт впізнавання рестриктази *XbaI*, необхідний для подальшого клонування.

Отримані ампліфікати клоновано у вектор pBluescript II KS⁺. Використання *blue-white colony selection* дало можливість ідентифікувати серед бактерій-трансформантів 20 білих колоній, 4 з яких (ТС1, ТС2, ТС3, ТС4) відібрано для подальшої роботи. Після виділення із цих колоній рекомбінантних плазмід їх обробки рестриктазою *XbaI* та електрофоретичного аналізу отриманих продуктів було ідентифіковано два фрагменти, довжина одного з яких відповідала довжині вектора, а іншого – довжині ПЛР продукту *Cat2*, що клонувався (рис. 3).

Для остаточної перевірки ідентичності клонованої кДНК *Cat2* було проведено сиквенування двох рекомбінантних плазмід – *pCat2* – ТС3 та *pCat2* – ТС4. Порівняння отриманих сиквенсів виявило, що в послідовності клону *pCat2* – ТС4 міститься заміна двох нуклеотидів, що має порушувати амінокислотну послідовність білка. Проте послідовність клону *pCat2* – ТС3 була ідентичною з очікуваною, що дозволяє використати цей клон для подальшого створення рослин-надекспресорів.

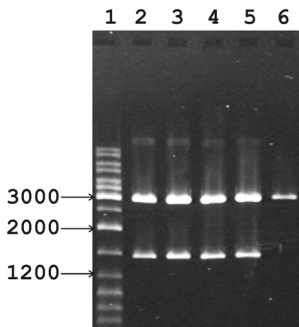


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції, отриманих після обробки рекомбінантної плазміди рестриктазою *Xba*I: 1 – маркер; 2–5 – рекомбінантні плазміди, 6 – векторна плазміда *pBluescript II KS*⁺

Висновки

Висока гомологія членів мультигенної родини може викликати труднощі при клонуванні окремих генів. Проте 5'- та 3'-нетрансльовані ділянки еволюціонують швидше, ніж кодуєча частина мРНК, що дозволяє застосовувати їх для створення високоспецифічних праймерів для ПЛР-ампліфікації індивідуальних кДНК. Використання цього продукту в якості матриці для ПЛР із другою парою праймерів дає можливість ампліфікувати лише кодуєчу частину мРНК та вносити у неї модифікації, необхідні для подальшого клонування та створення рослин-надекспресорів.

Перелік літератури

1. Arondel V., Vergnolle C., Cantrel C., Kader J.-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* – 2000. – Vol. 157, № 1. – P. 1–12.
2. Chen X., Wang M.L., Holbrook C., Culbreath A., Liang X., Brenneman T., Guo B. Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 29, № 2. – P. 389–403.
3. Grégoire C., Rémus-Borel W., Vivancos J., Labbé C., Belzile F., Bélanger R.R. Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense* // *Plant J.* – 2012. – Vol. 72, № 2. – P. 320–330.

4. Wena J., Vanek-Krebitz M., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Breiteneder H. The potential of *Betv1* homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants // *Mol. Phylog. Evol.* – 1997. – Vol. 8, № 3. – P. 317–333.
5. Li Yi, Darley C.P., Ongaro V., Fleming A., Schipper O., Baldauf S.L., McQueen-Mason S.J. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 128. – P. 854–864.
6. Barakat A., Szick-Miranda K., Chang I.F., Guyot R., Blanc G., Cooke R., Delseny M., Bailey-Serres J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 127. – P. 398–415.
7. Thygesen P.W., Dryl B., Robinson S.P. Polyphenol oxidase in potato (a multigene family that exhibits differential expression patterns) // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 109, № 2. – P. 525–531.
8. Mhamdi A., Hager J., Chaouch S., Queval G., Han Y., Taconnat L., Saindrenan P., Gouia H., Issakidis-Bourguet E., Renou J.-P., Noctor G. *Arabidopsis* glutathione reductase1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways // *Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 153, № 3. – P. 1144–1160.
9. An Y.-Q., McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., Chambliss S., Meagher R.B. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues // *Plant J.* – 1996. – Vol. 10. – P. 107–121.
10. Zhang D., Du Q., Xu B., Zhang Z., Li B. The actin multigene family in *Populus*: organization, expression and phylogenetic analysis // *Mol. Gen. Genom.* – 2010. – Vol. 284, № 2. – P. 105–119.
11. Higara S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. A large family of class III plant peroxidases // *Plant Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 42, № 5. – P. 462–468.
12. Santa-María G.E., Rubio F., Dubcovsky J., Rodríguez-Navarro A. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter // *Plant Cell.* – 1997. – Vol. 9, № 12. – P. 2281–2289.
13. O'Toole N., Hattori M., Andres C., Iida K., Lurin C., Schmitz-Linneweber C., Sugita M., Small I. On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants // *Mol Biol. Evol.* – 2008. – Vol. 25, № 6. – P. 1120–1128.
14. Peremyslov V.V., Mockler T.C., Filichkin S.A., Fox S.E., Jaiswal P., Makarova K.S., Koonin E.V., Dolja V.V. Expression, splicing, and evolution of the myosin gene family in plants // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 155, № 3. – P. 1191–1204.

15. Frugoli J.A., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R. Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in Angiosperms // Genetics. – 1998. – Vol. 149, № 1. – P. 355–365.
16. Frugoli J. A., Zhong H. H., Nuccio M. L., McCourt P., McPeck M. A., Thomas T. L., McClung C. R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112, № 1. – P. 327–336.
17. Saisho D., Nambara E., Naito S., Tsutsumi N., Hirai A., Nakazono M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. – 1997. – Vol. 35, № 5. – P. 585–596.
18. Du Y.-Y., Wang P.C., Chen J., Song C.P. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana* // J. Integr. Plant Biol. – 2008. – Vol. 50, № 10. – P. 1318–1326.
19. Skandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression // Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. – 1997. – Vol. 34. – P. 343–406.
20. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current protocol in molecular biology. – New York: Wiley, 1987–1988.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
22. DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
23. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. – 1997. – Vol. 25. – P. 3389–3402.
24. Kozak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1990. – Vol. 87. – P. 8301–8305.

Представлено В.В. Дмитренко
Надійшла 14.03.2013

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК ИЗОФОРМ КАТАЛАЗЫ CAT2 *ARABIDOPSIS THALIANA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУХЭТАПНОЙ ПЦР

Н.О. Діденко, Ю.О. Тинкевич,
Р.А. Волков, І.І. Панчук

Кафедра молекулярной генетики и биотехнологии, Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского, 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Цель. Члены мультигенных семейств часто бывают высокоомологичными в пределах кодирующей последовательности, что усложняет клонирование их индивидуальных кДНК. Целью работы было разработать стратегию, позволяющую эффективно клонировать кДНК таких сходных генов, и ее применение для клонирования кДНК каталазы 2 (*Cat2*) *Arabidopsis thaliana*. **Методы.** Сравнивались последовательности кДНК каталазы с целью выявления дивергировавших участков, подходящих для создания геноспецифичных праймеров. С использованием обратной транскриптазы и ПЦР была амплифицирована и клонирована кДНК *Cat2*. **Результаты.** Установлено, что кДНК трех генов каталаз *A. thaliana* высокоомологичны на 5'- и 3'-концах кодирующей области. Напротив, находящиеся рядом последовательности 5'- и 3'-нетранслированных участков отличаются. Соответственно, было создано пару генспецифичных праймеров, локализованных в 5'- та 3'-нетранслированных участках кДНК *Cat2*. Эти праймеры были использованы для первого этапа ПЦР. Полученные ПЦР-продукты использовались в качестве матрицы для второго этапа ПЦР. Соответствующие праймеры располагались точно в участках старт- и стоп-кодона, а также дополнительно содержали сайты рестрикции, необходимые для последующего клонирования. **Выводы.** Использование стратегии двухэтапной ПЦР позволяет эффективно клонировать индивидуальные кДНК близкородственных высокоомологичных членов мультигенных семейств.

Ключевые слова: мультигенные семейства, клонирование генов, кДНК, ПЦР, каталаза.

CLONING OF cDNA OF ARABIDOPSIS THALIANA CATALASE ISOFORM CAT2 APPLYING TWO-ROUND PCR

N.O. Didenko, Yu.O. Tynkevych, R.A. Volkov, I.I. Panchuk

Department of Molecular Genetics and Biotechnology Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str., 2
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Aim. Members of multigenic families are often highly homologous in the coding region, which makes it difficult to clone their individual cDNAs. The aim of the study was to develop a strategy that allows an efficient cloning of cDNA for such similar genes and to apply the strategy for cloning of catalase 2 (*Cat2*) cDNA of *Arabidopsis thaliana*. **Methods.** Sequences of catalase cDNAs were compared in order to find divergent regions suitable for design of gene-specific

primers. *Cat2* cDNA was amplified by reverse transcription PCR and cloned. **Results.** It was demonstrated that the cDNAs of three catalase genes of *A. thaliana* are highly similar at the 5' and 3' ends of the coding region. In contrast, the adjacent sequences of 5' and 3' UTR appeared to be divergent. Accordingly, a pair of gene-specific primers localized in the 5' and 3' UTR of *Cat2* cDNA was designed and utilized for the first round of PCR amplification. The obtained PCR products were used as a template in the second round of PCR. The corresponding primers were located exactly at the start and stop codons of *Cat2* cDNA and also contained as extensions additional restriction sites for subsequent cloning. **Conclusions.** Application of the two-round PCR strategy allows efficient cloning of individual cDNAs of closely related highly similar members of multigenic families.

Key words: multigenic family, gene cloning, cDNA, PCR, catalase.